

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ CỐ ĐỊNH ENZYME PROTEASE TỪ VI KHUẨN *BACILLUS SP. S9* LÊN GEL Ca-ALGINATE

RESEARCH ON OBTAINING AND IMMOBILIZATION OF PROTEASE FROM *BACILLUS SP. S9* ON Ca-ALGINATE GEL

Bùi Xuân Đông^{1*}, Phạm Thị Mỹ²

¹Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: xdbui@dut.udn.vn

(Nhận bài / Received: 03/3/2024; Sửa bài / Revised: 05/4/2024; Chấp nhận đăng / Accepted: 09/5/2024)

Tóm tắt - Enzyme là chất xúc tác sinh học có khối lượng phân tử lớn, enzyme được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm. Mới đây, các nhà nghiên cứu đã sử dụng một phương pháp đơn giản để tổng hợp các peptide có hoạt tính sinh học bằng cách thủy phân protein bằng enzyme, đặc biệt là bằng enzyme cố định. Peptide có hoạt tính sinh học là một nhóm các phân tử sinh học nằm trong cấu trúc của protein và trở nên hoạt động sau khi phân tách khỏi protein. Trong bài báo này, nhóm nghiên cứu đã chế tạo được enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate. Ở điều kiện hoạt động tối ưu ($pH_{op} = 7$, $t_{op} = 50^{\circ}C$, $\tau_{op} = 35$ phút), hoạt độ enzyme cố định đo được là 180,03 IU/mg, hiệu suất cố định *Bacillus protease* lên chất mang là 84,34 %. Kết quả cố định enzyme *Bacillus protease* trên Ca-alginate sẽ được sử dụng để tổng hợp các peptide ngắn có hoạt tính sinh học trong sữa đậu nành.

Từ khóa - *Bacillus subtilis*; enzyme protease; điện di Zymogram; enzyme cố định; sự thủy phân

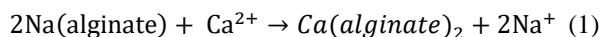
1. Đặt vấn đề

Enzyme cố định là enzyme được cố định vật lý vào một số vị trí xác định trên chất mang, vẫn giữ được hoạt tính xúc tác như enzyme tự do và có thể sử dụng lại nhiều lần. Enzyme cố định có nhiều ưu điểm hơn so với enzyme tự do. Chúng có thể được sử dụng lặp lại nhiều lần trong thời gian dài, không tan và không lẫn vào sản phẩm cuối nên không ảnh hưởng đến màu sắc và hương vị của sản phẩm. Khi dùng enzyme cố định cũng có thể nhanh chóng dừng phản ứng khi cần thiết bằng cách loại bỏ enzyme khỏi hỗn hợp phản ứng. Chúng cũng khá bền với các yếu tố như nhiệt độ, pH, và dung môi hữu cơ. Tuy nhiên, việc sử dụng enzyme cố định cũng có một số hạn chế. Chúng có thể gặp phải sự hạn chế trong việc chuyển khối (sự tiếp xúc enzyme với cơ chất tại trung tâm hoạt động), có thể mất hoạt tính sau khi cố định, và không hiệu quả khi áp dụng cho cơ chất rắn. Hơn nữa, chúng có thể mất đi tính thích nghi hình thể. Tuy nhiên, những hạn chế này không đáng kể so với những lợi ích mà enzyme cố định mang lại. Do đó, có ngày càng nhiều nghiên cứu mới cũng như công nghệ mới được phát triển để chế tạo enzyme cố định [1]. Gần đây, các nhà khoa học đã áp dụng phương pháp đơn giản nhất để tổng hợp các peptide ngắn có hoạt tính sinh học là thủy phân protein nguyên thủy bằng enzyme, đặc biệt là bằng enzyme cố định. Peptide có hoạt tính sinh học là một nhóm các phân

Abstract - Enzymes are macromolecular biocatalysts, widely used in food industry. Recently, the most common and simple method for producing bioactive peptides is enzyme hydrolysis, especially by immobilized enzyme. Recently, the most simple method for producing bioactive peptides is enzyme hydrolysis, especially by immobilized enzyme. Bioactive peptides are a group of biological molecules that are normally buried in the structure of parent proteins and become active after the cleavage of the proteins. In this paper, the research team has created the enzyme *Bacillus protease* immobilized on Ca - alginate. Under optimal conditions ($pH_{op} = 7$, $t_{op} = 50^{\circ}C$, $\tau_{op} = 35$ minutes), the activity of the immobilized enzyme was measured at 180.03 IU/mg, and the efficiency of immobilizing *Bacillus protease* onto the carrier was 84.34%. These results of the immobilized enzyme *Bacillus protease* on Ca-alginate will be used to produce bioactive short peptides in soybean milk.

Key words - *Bacillus subtilis*; enzyme protease; Zymogram electrophoresis; immobilized enzyme; hydrolysis

tử sinh học nằm trong cấu trúc của protein và trở nên hoạt động sau khi phân tách khỏi protein đó, chúng có thể được sản xuất bằng cách thủy phân thực phẩm bằng enzyme như sữa, thịt động vật, cá, ngô, lúa mì, đậu nành và trứng. Peptide có hoạt tính sinh học có nhiều ứng dụng, chẳng hạn như hoạt tính kháng khuẩn, hạ huyết áp, chống oxy hóa, tác dụng hạ lipid máu, chống béo phì, khả năng liên kết khoáng chất, tác dụng trị đái tháo đường và chống lão hóa [2]. Việc lựa chọn chất mang là công đoạn rất quan trọng trong việc chế tạo enzyme cố định. Các polymer sinh học có thể được sử dụng làm chất mang để cố định enzyme vì chúng có các nhóm chức thích hợp và dễ dàng biến đổi hóa học. Một trong những chất mang thích hợp cho mục đích này là calcium alginate (Ca-alginate). Ca-alginate được chế tạo bằng phản ứng hóa học giữa sodium alginate (Na-alginate) với ion Ca^{2+} theo kiểu trao đổi ion và tạo thành biocomposite bền vững không tan trong nước và dễ dàng tạo hạt hoặc màng. Phản ứng tạo thành biocomposite Ca-alginate được mô tả phương trình (1):



Ca-alginate gồm một hệ thống matrix và chính hệ thống này là yếu tố cơ bản để bẫy các hợp chất sinh học và tế bào. Chế tạo enzyme cố định trong gel alginate được công nhận là một phương pháp nhanh chóng, rẻ tiền, không độc hại, có tính tương hợp sinh học cao và enzyme có tính ổn định

¹ The University of Danang - University of Science and Technology, Vietnam (Bui Xuan Dong)

² The University of Danang - University of Science and Education, Vietnam (Pham Thi My)

về cấu trúc [3]. Bài báo này trình bày các kết quả chế tạo enzyme protease cố định lên gel Ca-alginate, khảo sát đặc tính xúc tác của enzyme cố định và thăm dò khả năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sữa đậu nành có hoạt tính sinh học.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Giống vi khuẩn S9 được phân lập và định danh sơ bộ là vi khuẩn *Bacillus subtilis* (kí hiệu là vi khuẩn S9) tại PTN Công nghệ sinh học trực thuộc Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng. Vi khuẩn S9 có đặc tính là vi khuẩn Gram (+) và không gây bệnh. Vi khuẩn S9 có khả năng sinh enzyme protease ngoại bào, enzyme này hoạt động tối thích ở $t_{op} = 50^{\circ}\text{C}$ và $\text{pH}_{op} = 7,5-8,5$ [4].

Calci clorua rắn (110,99 g/mol) được đặt hàng từ Trung Quốc và muối sodium alginate có xuất xứ từ Nhật Bản, hai hóa chất này được dùng để chế tạo gel Ca-alginate. Các hóa chất thông dụng khác thường được sử dụng trong phân tích hóa sinh và vi sinh, tất cả đều đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm định danh chủng vi khuẩn S9 bằng kỹ thuật định danh phân tử

- Nuôi cấy vi khuẩn S9 trong môi trường tăng sinh protease để thu sinh khối phục vụ định danh phân tử: Vi khuẩn S9 được nuôi cấy trên môi trường LB trong 16 giờ. Sau đó, huyền phù tế bào (1%, v/v) được chuyển sang môi trường sản xuất protease chứa 1% casein, 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; K_2HPO_4 0,1%; 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; NaCl 0,05%, pH 7,5 và nuôi cấy liên tục ở 35°C trong 24 giờ, lắc 180 vòng/phút.

- Định danh phân tử: DNA vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và cs [5]. Sinh khối tế bào được thu hồi bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy, hòa tan lại trong 500 μL đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; CTAB 2%). Hỗn hợp này sau đó được ủ ở 65°C trong 10 phút. Dịch chiết tế bào chứa DNA tổng số được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA tổng số được chiết xuất và tinh sạch bằng cách sử dụng 700 μL hỗn hợp phenol:chloroform:isopropanol (tỷ lệ 25:24:1), vortex và ly tâm lạnh ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C . Khoảng 400 μL dịch nổi được chuyển sang ống 1,5 mL mới và DNA tổng số được kết tủa với 800 μL isopropanol tinh khiết. Tiến hành rửa tủa DNA bằng etanol 70% và hòa tan trong 50 μL nước cất vô trùng. DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% ở 45 V trong 30 phút. Gel được quan sát khi sử dụng đèn LED (Blue Light Transilluminator).

Tiếp theo, DNA tổng số được sử dụng làm khuôn để khuếch đại phản ứng PCR trình tự 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' GGTTACCTGTTACGACTT-3). Bộ PCR bao gồm 6 μL hỗn hợp chính, 10 pmol cho mồi, 50 ng DNA bộ gen và 12 μL nước cất. Sau khi biến tính ở 95°C trong 5 phút, chu trình PCR nhiệt bao gồm các bước biến tính ở 95°C trong 1 phút, bắt cặp ở 55°C trong 1 phút, kéo dài từ

72°C trong 1 phút 30 giây và lặp lại 30 chu kỳ. Phản ứng PCR sau đó được ủ ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Sản phẩm PCR là trình tự nucleotide thông qua Firstbase (Malaysia). Trình tự nucleotide được so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen. Cây tạo ra một loài được xây dựng bằng Phần mềm Mega X [6].

2.2.2. Bố trí thí nghiệm xác định khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào của *Bacillus sp. S9* và khối lượng phân tử của enzyme protease ngoại bào bằng zymogram

Sau khi định danh được vi khuẩn S9 là *Bacillus sp. S9* tiếp tục thực hiện các thí nghiệm:

- Kiểm tra khả năng tổng hợp enzyme protease của *Bacillus sp. S9* được thực hiện thông qua kỹ thuật nuôi cấy chấm điểm trên đĩa thạch. Vi khuẩn được nuôi cấy chấm điểm trên đĩa thạch sử dụng tủ ẩm ở 37°C trong 24 giờ để ổn nhiệt và tạo ra khuẩn lạc. Trong quá trình nuôi cấy, *Bacillus sp. S9* sẽ tự tổng hợp enzyme protease và tiết ra môi trường đĩa thạch, thủy phân casein và tạo thành vòng thủy phân xung quanh khuẩn lạc [4].

- Xác định khối lượng phân tử của enzyme protease của *Bacillus sp. S9* bằng phương pháp điện di Zymogram, thực hiện như sau: 15 μL enzyme ngoại bào được trộn với 2X loading dye. Hỗn hợp này sau đó được đưa vào SDS-PAGE với 5% stacking gel và 12% separating chứa 0,8 mg/mL casein. Gel được rửa hai lần bằng Triton X-100 2,5% (v/v) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và ba lần bằng nước cất, sau đó ủ trong đệm phản ứng (50 mmol/L Tris - HCl pH 8,3; 50 mmol/L CaCl_2) ở 35°C trong 2 giờ. Gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R-250 và được nhuộm trong dung dịch metanol axetat. Sự xuất hiện của một vùng rõ ràng trên nền xanh của gel được đánh giá là hoạt động của protease [7]. Phân tử lượng của protease được thực hiện bằng cách so sánh với thang chuẩn 161-0371 của Sigma, bao gồm myosin (200.000 Da), β -galactosidase (116.250 Da), phosphorylase b (97.400 Da), serum albumin (66.200 Da), ovalbumin (45.000 Da), cacbonic anhydrase (31.000 Da), trypsin inhibitor (21.500 Da), lysozym (14.400 Da) và aprotinin (6.500 Da). Thang chuẩn được chạy trên cùng gel với protease, sau điện di được cắt ra và nhuộm riêng ngay mà không cần xử lý với casein.

2.2.3. Bố trí thí nghiệm chiết tách enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus sp. S9*

- Nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus sp. S9* trong môi trường sản xuất protease: Để thu nhận enzyme protease tiến hành nuôi cấy *Bacillus sp. S9* trong bình tam giác 200 mL, pha chế môi trường dinh dưỡng gồm các chất: nước cất vô trùng, bổ sung casein 0,05%; cao thịt 0,3%; pepton 1,0%; cao nấm men 1,0%; NaCl 0,5%. Giống gốc được bổ sung vào môi trường dinh dưỡng vô trùng với tỷ lệ là 10%. Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn ở $t = 35^{\circ}\text{C}$, tốc độ lắc 120 vòng/phút, trong thời gian 14,0 giờ [8].

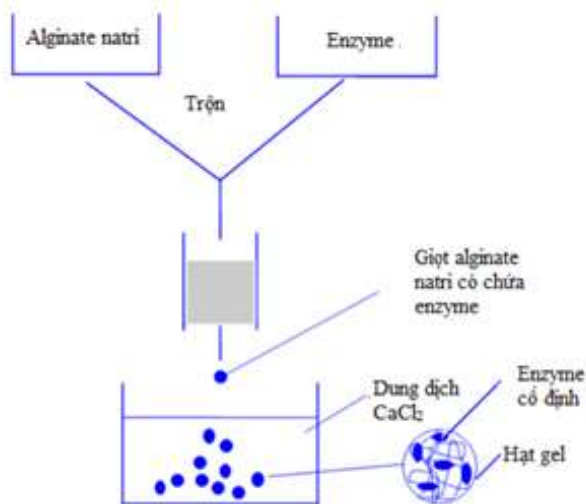
- Chiết xuất enzyme ngoại bào: Enzyme protease ngoại bào sau 14 h nuôi cấy trong môi trường sản xuất protease được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, bổ sung acetone lạnh theo tỉ lệ (1:4) và ủ qua đêm, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút và loại bỏ dịch nổi. Để

acetone bay hơi hoàn toàn trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng và hoà tan bằng đệm potassium phosphate pH 7,5 sao cho hoạt độ đạt 250 IU/mg và bảo quản ở nhiệt độ 0-4°C [4]. Enzyme thu được gọi tắt là *Bacillus protease*.

Từ đây, trong phạm vi bài báo này enzyme protease ngoại bào thu nhận từ *Bacillus sp. S9* được viết tắt là “*Bacillus protease*” đối với enzyme tự do và “*Bacillus protease cố định*” với enzyme cố định để thuận tiện cho việc trình bày.

2.2.4. Cố định enzyme *Bacillus protease* trên hạt *Ca-alginate* và xác định hiệu suất cố định enzyme

Tiến hành thí nghiệm cố định enzyme *Bacillus protease* trên hạt *Ca-alginate* theo [3] như Hình 1.



Hình 1. Mô hình minh họa cố định *Bacillus protease* trên *Ca-alginate* theo [3]

Chế phẩm *Bacillus protease* tự do (250 IU/mg) cần phải trộn đều với dung dịch Na-alginate 1% theo tỷ lệ 4:1 (v/v) đến đồng nhất. Sau đó, dùng ống tiêm và kim tiêm để nhỏ hỗn hợp “Na-alginate - *Bacillus protease*” vào dung dịch CaCl₂ 0,1 M (kim tiêm có đường kính lỗ kim là 0,30 x 13 mm), sau khi nhỏ sẽ tạo thành các hạt enzyme cố định. Hạt enzyme cố định tạo ra sẽ được ngâm trong dung dịch tạo gel CaCl₂ 0,1 M trong 30 phút. Sau khi ngâm, hạt enzyme cố định được lọc để loại bỏ dung dịch bằng giấy lọc, tiếp tục rửa hạt enzyme 2 lần với nước cất, sau đó bảo quản trong bình tam giác có nắp đậy. Hạt enzyme cố định được ngâm bảo quản trong nước đã khử ion vô trùng ở nhiệt độ 0-4 °C, bảo quản trong vòng 10 – 15 tuần. Độ lớn của các hạt enzyme cố định được xác định bằng thước kẹp Vernier Caliper (0-150 mm) thông qua đo đường kính của hạt enzyme cố định, và sau đó tính trung bình cho mỗi mẫu thí nghiệm. Hiệu suất gắn enzyme tự do lên chất mang (H_{cd}) được tính theo công thức toán học (1):

$$H_{cd} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó: C₁ – là hàm lượng enzyme (μg/mL) trong dung dịch Na-alginate; C₂ – là hàm lượng enzyme (μg/mL) trong dung dịch CaCl₂ sau khi đã tách enzyme cố định (enzyme-*Ca-alginate*) và nước vô trùng rửa enzyme cố định. Ở đây, phương pháp Bradford được dùng để đo hàm lượng protein hòa tan.

2.2.5. Khảo sát sự phụ thuộc của hoạt tính enzyme *Bacillus protease* cố định vào pH, τ và t bằng phương pháp khảo sát đơn biến

Hoạt độ enzyme protease cố định được khảo sát trong mối tương quan sự thay đổi pH môi trường, thời gian (τ) phản ứng và nhiệt độ (t) của môi trường phản ứng: pH được khảo sát ở các mức pH = 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 và 9,0, bước nhảy p = 0,5 (cố định τ = 1,0 h, t = 50°C) để xác định pH tối ưu (pH_{op}), thời gian phản ứng τ = 1,0 h được tham khảo trong nghiên cứu [8]; thời gian phản ứng tại các thời điểm τ = 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 (phút), bước nhảy p = 5 phút (giữ pH = 7; t = 50°C) để xác định thời gian phản ứng tối ưu (τ_{op}); nhiệt độ ở các mức 30; 35; 40; 45; 50; 55 và 60 (°C), bước nhảy p = 5°C (giữ pH = 7,0 và τ = 35 phút) để xác định nhiệt độ phản ứng tối ưu (t_{op}).

2.2.6. Các phương pháp phân tích

- Xác định hoạt tính protease tự do theo Anson cải tiến [9]. Từ 2 ống nghiệm ban đầu, tiến hành cho vào mỗi ống nghiệm 5 mL cơ chất (casein 0,65%) và đặt tất cả vào máy ổn định nhiệt độ ở 37°C. Sau 5 phút, thêm vào mỗi ống nghiệm 1 mL dung dịch enzyme (cũng ở nhiệt độ 37°C) với hoạt tính từ 0,1-0,2 IU/mg. Lắc trộn đều và để ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, thêm vào mỗi ống nghiệm 5 mL dung dịch trichloacetic acid 0,11 M, lắc trộn nhanh để protein dư và các hợp chất cao phân tử bị kết tủa. Giữ các ống nghiệm ở 37°C thêm 30 phút và sau đó lọc lấy dung dịch. Tiếp tục, lấy 2 mL dung dịch lọc và 5 mL dung dịch Na₂CO₃ 0,5 M cho vào mỗi ống nghiệm, trộn đều và thêm 1 mL Folin. Sau 30 phút phản ứng, dung dịch sẽ có màu xanh, và sử dụng máy so màu ở bước sóng 660 nm để đo. Hoạt tính enzyme được xác định dựa trên đường chuẩn tyrosin. Mẫu ĐC thì thay dung dịch enzyme bằng 1 mL nước cất. Pha dung dịch gốc tyrosin với nồng độ 0,11 M. Sau đó, cho dung dịch tyrosin vào 7 ống nghiệm theo thể tích tăng dần từ: 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,50 và 0,80 (mL). Cho vào 7 ống nước cất lượng nước cất tương ứng để tổng thể tích mỗi ống nghiệm đạt 2 mL, và mẫu đối chứng có 2 mL nước cất. Tiếp theo, thêm vào mỗi ống nghiệm 5 mL dung dịch Na₂CO₃ 0,5 M và 1 mL thuốc thử Folin cũng như mẫu đối chứng. Hỗn hợp phản ứng được chạy ổn nhiệt trong 30 phút, tiếp tục đem mẫu đi đo bằng máy quang phổ với bước sóng 660 nm bằng Máy quang phổ tự động UV-2650 Spectro UV-VIS RS (Labomed, Hoa Kỳ). Xây dựng đường chuẩn tyrosin với trục hoành là nồng độ tyrosin (micromol/mL), trục tung là mật độ quang OD.

Hoạt độ enzyme tự do được tính theo công thức 2:

$$AE = \frac{\mu\text{mol tyrosine} \times 11}{10 \times 2 \times 1} \quad (2)$$

Trong đó: AE là hoạt độ enzyme tính bằng IU/mg; 11 là tổng thể tích (tính bằng mililit) của mẫu khảo nghiệm; 10 là thời gian khảo nghiệm (tính bằng phút); 1 là thể tích enzyme sử dụng (tính bằng mililit); 2 là thể tích đã sử dụng (tính bằng mililit).

- Hoạt độ của hạt enzyme protease cố định được đo như sau: Lấy 1 gr hạt enzyme cố định đưa vào 25 mL đệm Tris-HCl 0,05M, pH 7,0 để phá vỡ cấu trúc hạt enzyme enzyme tự do được giải phóng và sau đó tiến hành đo hoạt độ enzyme theo phương pháp Anson cải tiến tương tự như với enzyme tự do ban đầu [9].

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

- Mỗi thí nghiệm trong nghiên cứu đã được lặp lại ít nhất 3 lần, kết quả là giá trị trung bình với sai số.

- Tất cả các dữ liệu được tính toán và xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010.

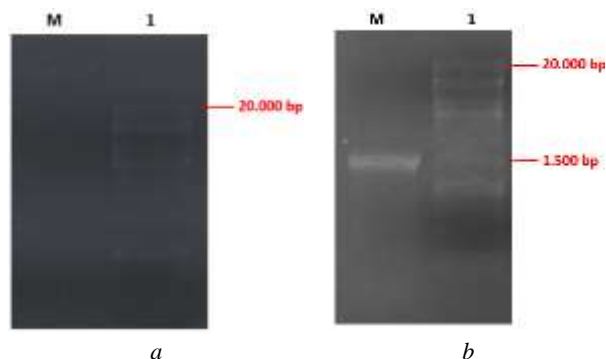
3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

3.1. Kết quả định danh chủng vi khuẩn S9 bằng kỹ thuật định danh phân tử

Độ thuần khiết của giống gốc là yếu tố rất quan trọng trong sản xuất, vì thế việc kiểm tra ban đầu là rất quan trọng.



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc (a) và tế bào vi khuẩn S9 x 400 lần (b)



Hình 3. Điện di sản phẩm DNA tổng số chủng vi khuẩn S9 (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1: sản phẩm DNA tổng số của vi khuẩn) và điện di sản phẩm DNA tổng số chủng vi khuẩn S9 (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1: sản phẩm PCR)

Phân tích các kết quả xác định độ thuần khiết của giống gốc (kí hiệu là vi khuẩn S9) trên đĩa Petri (Hình 2a và 2b) nhận thấy, giống không bị thoái hóa và tạp nhiễm, cụ thể: khuẩn có cấu trúc hình tròn, xung quanh khuẩn mọc dạng răng cưa, có sự nhăn lại trên bề mặt, bằng phương pháp nhuộm Gram thì nhận thấy chúng thuộc nhóm Gram (+). Những đặc điểm vi thể của giống vi khuẩn S tương đồng với mô tả về các chủng *Bacillus spp.* của Claus và Berkeley [10].

Vi khuẩn S tiếp tục được định danh bằng sinh học phân tử hiện đại: trình tự vùng gen 16S rRNA được giải để định danh và tiếp tục dùng công cụ BLAST N để xác định độ đồng hình của trình tự gen vi khuẩn S với trình tự gen của các dòng vi khuẩn khác trong GenBank cung cấp bởi Trung tâm Quốc gia về Công nghệ Sinh học (National Center for Biotechnology - NCBI) thuộc Thư viện Y học Quốc gia Hoa Kỳ. Kết quả điện di sản phẩm DNA tổng số chủng vi khuẩn S được trình bày trên Hình 3a và 3b. Kết quả trên Hình 3 cho thấy, DNA tổng số sau khi được

tách chiết không bị đứt gãy, băng gọn, có thể tiếp tục sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng PCR, định danh phân tử. Hình ảnh điện di được kiểm tra trên gel 0,8%. Sản phẩm PCR có băng đơn, rõ nét và có kích thước khoảng 1500 bp phù hợp với kích thước dự đoán của vùng trình tự 16S rRNA.

Trình tự nucleotid vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn S9 của dòng vi khuẩn S:

```
GTTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTG
ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGC
ATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCA
CTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACTGAGAGGGTGTGATCGGCCACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTT
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTA
CCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
ACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGAC
GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG
AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGAC
GTCCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAG
TTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGGACG
GAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCT
GTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACA
CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA
```

Dựa trên đặc điểm khuẩn lạc cùng với trình tự gen mã hoá, vi khuẩn được xác định thuộc chi *Bacillus sp.* với độ tương đồng 99%. Trình tự 16 rRNA của S9 được tiến hành so sánh với một số chủng vi khuẩn khác chuẩn trên Genbank: *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC15535, *Bacillus siamensis* KCTC13613, *Bacillus velezensis* CR-502, *Bacillus velezensis* BCRC17467, *Bacillus velezensis* NRRLB-41580, *Bacillus subtilis* IAM12118, *Bacillus licheniformis* ATCC14580, *Bacillus pumilus* ATCC7061,

Bacillus cereus ATCC14579, *Bacillus thuringiensis* IAM12007, *Bacillus benzoovorans* NCIMB12555, *Paenibacillus polymyxa* IAM13419 bằng phần mềm Mega X. Nhận thấy, trình tự gen của chủng S9 tương đồng với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* chủng NBRC 15535 dựa trên trình tự ở vùng 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, tỉ lệ 100%. *Bacillus siamensis* chủng KCTC 13613 dựa trên trình tự ở vùng 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, tỉ lệ 99,93%. *Bacillus velezensis* chủng CR-502 dựa trên trình tự ở vùng 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, tỉ lệ 99,93%.



Hình 4. Kết quả BLAST trình tự nucleotide vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn S9 với dữ liệu ngân hàng gen

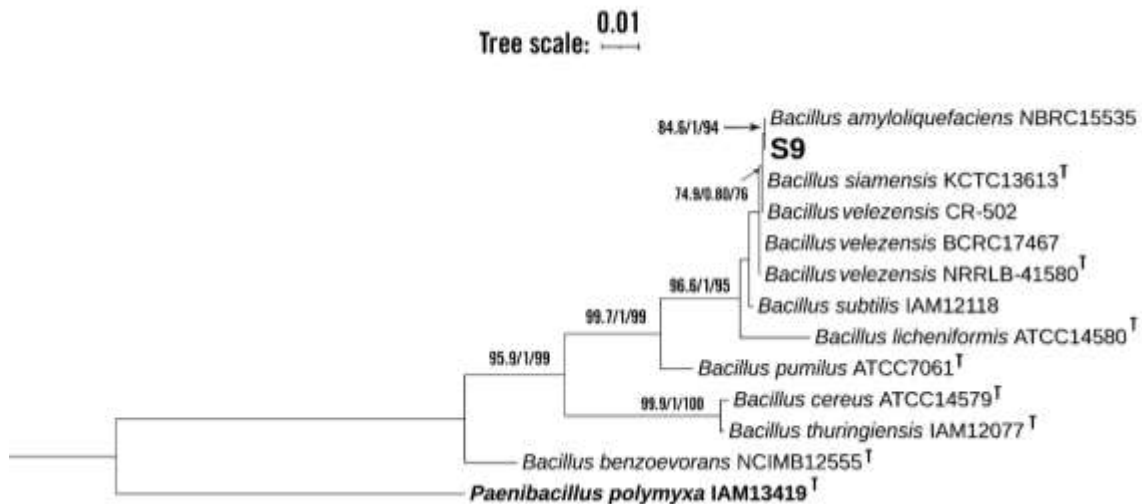
Vì vậy, chủng này được đặt tên là *Bacillus sp.* S9. Cây phát sinh loài của chủng *Bacillus sp.* S9 được trình bày trên

Hình 5. Trình tự nucleotide 16S rRNA đã được gửi lên ngân hàng gen (GenBank) với mã số MZ386456.

3.2. Kết quả xác định khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào của *Bacillus sp.* S9 và khối lượng phân tử của enzyme protease ngoại bào bằng zymogram

Bacillus sp. thường được dùng để sản xuất các loại enzyme như amylase, protease nhằm phục vụ công nghiệp và trong y học. Đại đa số các enzyme thủy phân protein đều được sản xuất từ nhiều dòng *Bacillus sp.* khác nhau, đặc biệt là *Bacillus subtilis* với độ ổn định cao [11], cho thấy có thể sản xuất enzyme của dòng vi khuẩn S. Các tác giả đã nuôi cấy chấm điểm vi khuẩn S để kiểm chứng khả năng sinh enzyme protease ngoại bào và kết quả nhuộm màu vòng thủy phân do protease xúc tác chuyển hóa như Hình 6, đường kính vòng thủy phân đo được từ 1,7-1,8 cm [4].

Khối lượng phân tử và hoạt tính của enzyme protease được đánh giá bằng phương pháp điện di zymogram. Hình ảnh zymogram cho thấy hai vùng sáng có độ phân giải casein riêng biệt trên gel, khối lượng phân tử đo được là 39 và 70 kDa (Hình 7). Các dải sáng thu chứng minh enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn S đã thủy phân cơ chất casein. Sự xuất hiện của 2 dải băng có kích thước khác nhau là do enzyme được sử dụng là enzyme thô, dẫn đến sự hiện diện của các cấu trúc cuộn xoắn khác nhau trong cấu trúc protein. Các nghiên cứu khác đã báo cáo về protease kiềm có kích thước phân tử *Bacillus sp.* RKY3 (38 kDa) [12] và *Bacillus sp.* SM2014 (71 kDa) [13].



Hình 5. Cây phát hệ di truyền loài của chủng vi khuẩn *Bacillus sp.* S9 và một số loài *Bacillus sp.* khác trên Genbank

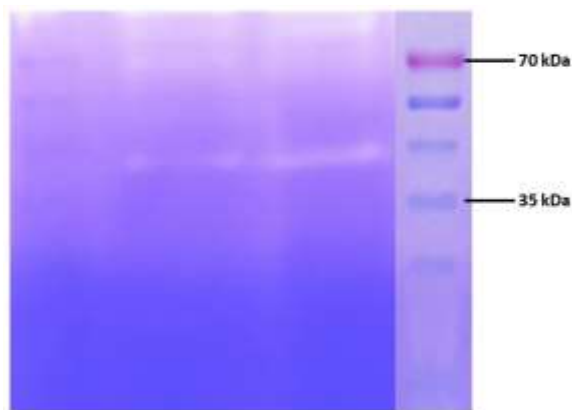
Bảng 1. Kết quả xác định hoạt độ enzyme *Bacillus protease* cố định và hiệu suất gắn enzyme trên gel Ca-alginate

Chỉ tiêu (đo đạc)	Hàm lượng enzyme (protein)	Hoạt độ (AE)	Kết quả đo khác
Kích thước hạt enzyme cố định, mm	-	-	3.0
C ₁ * (µg/mL)	200±0,3	-	-
C ₂ * (µg/mL)	31,32±0,5	-	-
Hiệu suất gắn enzyme, H _{cd} (%)	84,34	-	-
Hoạt độ enzyme tự do, AE tự do (IU/mg)	-	250±0,3	-
Hoạt độ enzyme cố định, AE cố định (IU/mg)	-	200,3±0,2	-
AE còn lại (%)	-	80,1	-

AE - là chữ viết tắt của hoạt độ enzyme (activity of enzyme); * - tham khảo công thức toán học (2).



Hình 6. Khả năng sinh protease ngoại bào của chủng *Bacillus sp. S9*



Hình 7. Điện di Zymogram protease ngoại bào của chủng *Bacillus sp. S9*

Ngoài ra, một số protease kiềm có trọng lượng: *B. licheniformis* RSP-09-37(55kDa) [14]; *B. licheniformis* (32 kDa) [15]; *B. subtilis* DM-04 (16.9 kDa) [16].

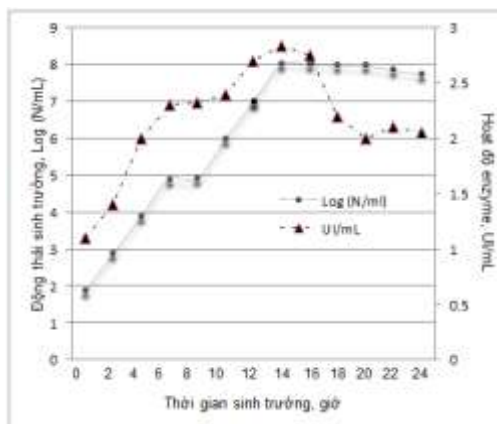
Kết quả tách chiết enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn Bacillus sp. S9

Protease là nhóm enzyme vai trò sinh học là thủy phân các phân tử protein và tham gia vào nhiều con đường sinh hóa khác nhau trong tế bào sống. Trong tế bào và mô, protease rất cần thiết vì nó thực hiện nhiều chức năng sinh học, ví như, vai trò rất hữu ích của protease trong quá trình tiêu hóa, protease giúp phá vỡ các liên kết peptide trong protein của thức ăn và giải phóng các acid amin cần thiết cho cơ thể hấp thu.

Thời điểm thu hoạch sinh khối được xác định bằng đường cong sinh trưởng của *Bacillus sp. S9* (Hình 8), tại hoạt độ enzyme protease cực đại là $2,833 \pm 0,085$ IU/mL tại thời điểm 14 giờ, sau 14 giờ động thái sinh trưởng của vi khuẩn giảm dần và hoạt độ enzyme protease trong canh trường cũng giảm dần từ mốc 14 giờ đến 24 giờ. Sự thay đổi này có thể lý giải như sau: sau 14 giờ nuôi cấy, lượng tế bào chết tăng dần, do vậy, hàm lượng protease được tổng hợp và tiết ra môi trường giảm dần; một khía cạnh khác, lượng enzyme protease trong canh trường có thể đã bị hư hại bởi vi sinh vật và yếu tố tự phân autohydrolysis).

Hình 9 là mẫu chế phẩm enzyme protease từ *Bacillus sp. S9*, chế phẩm lỏng đồng nhất, có màu nâu đậm, có mùi

đặc trưng của sản phẩm tương tự như các chế phẩm protease khai thác từ các chủng vi khuẩn *Bacillus sp.*, hoạt độ protease đo được bằng phương pháp Anson là $2,833 \pm 0,085$ IU/mL.



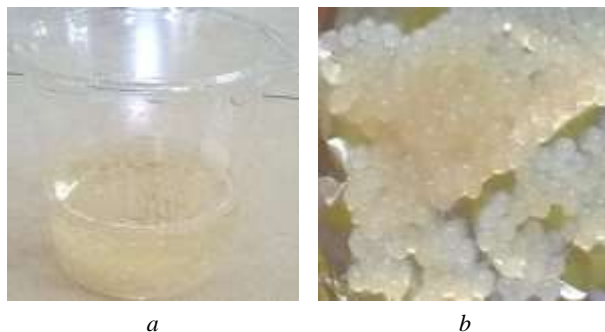
Hình 8. Xác định thời điểm thu enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus sp. S9* bằng đường cong sinh trưởng



Hình 9. Mẫu chế phẩm enzyme protease từ canh trường vi khuẩn *Bacillus sp. S9*

3.3. Kết quả cố định enzyme *Bacillus protease* trên hạt *Ca-alginate*

Chế phẩm enzyme *Bacillus protease* cố định trên hạt *Ca-alginate* đã được chế tạo thành công trong điều kiện PTN. Enzyme cố định có một số đặc điểm: 1) hình dạng là hạt tròn đều, đường kính đạt 3 mm; 2) màu sắc là màu trắng đục; 3) hạt enzyme có tính đàn hồi, bền và không bị vỡ (Hình 10a và 10b).



Hình 10. Sự tạo hạt enzyme cố định trên gel *Ca-alginate* (a) và enzyme *Bacillus protease* cố định trên hạt *Ca-alginate* (b)

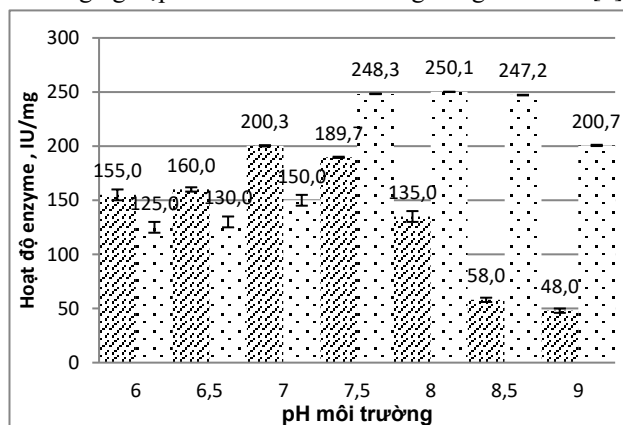
Kết quả tính toán cho thấy, từ hỗn hợp 250 mL protease-Na-alginate khi tạo hạt thu được 140 g hạt ướt. Từ Bảng 1, cho thấy hiệu suất gắn enzyme (Hcd) tính theo hàm lượng protein là 84,34 %, hoạt độ (AE) enzyme cố định là 200,3 IU/mg được đo ở pH = 7, t = 37 °C, thời gian phản ứng $\tau = 10$ phút. Kết quả nghiên cứu tương ứng với nghiên

cứu của Mai Ngọc Dũng khi cố định enzyme lên hạt Ca-alginate, tác giả này công bố hiệu suất cố định đạt trên 84,6 % [17].

3.4. Kết quả xác định các đặc tính của enzyme *Bacillus protease* cố định bằng phương pháp khảo sát đơn biến

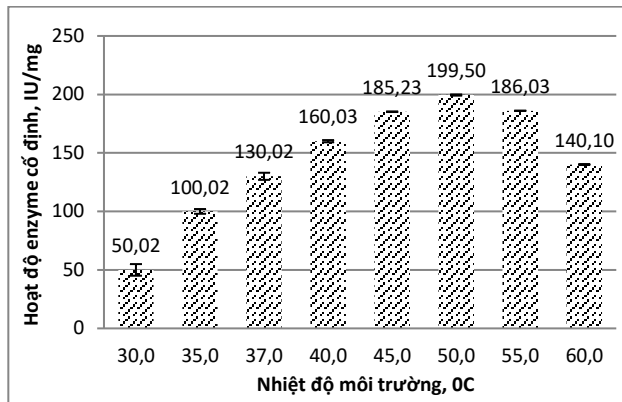
Hoạt độ enzyme phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: pH, t, thời gian phản ứng, chất hoạt hóa, chất kim hãm,... nên khi khám phá các đặc tính enzyme người ta thường xem xét ảnh hưởng của các yếu tố này lên hoạt độ enzyme.

pH của môi trường phản ứng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme, tốc độ phản ứng enzyme tăng hay giảm phụ thuộc vào pH môi trường phản ứng, do đó, mỗi enzyme có một vùng pH hoạt động tối ưu, tức là ở vùng pH đó tốc độ phản ứng enzyme đạt mức cao nhất [7]. Sự phụ thuộc của hoạt độ enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate vào pH môi trường phản ứng được trình bày trên Hình 11. Đồ thị trên Hình 11 cho thấy rằng, hoạt độ của enzyme cố định tăng dần trong khoảng pH từ 6 đến 7 và giảm dần trong khoảng pH từ 7 đến 9. Hoạt độ enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate đạt giá trị cực đại (200,3 IU/mg) tại pH = 7. Do đó, pH tối ưu của *Bacillus protease* cố định có xu hướng dịch chuyển về vùng pH thấp hơn so với enzyme tự do, điều này làm phản ánh trong nghiên cứu của tác giả Qamar và đồng nghiệp vào năm 2020 là tương đồng với nhau [3].

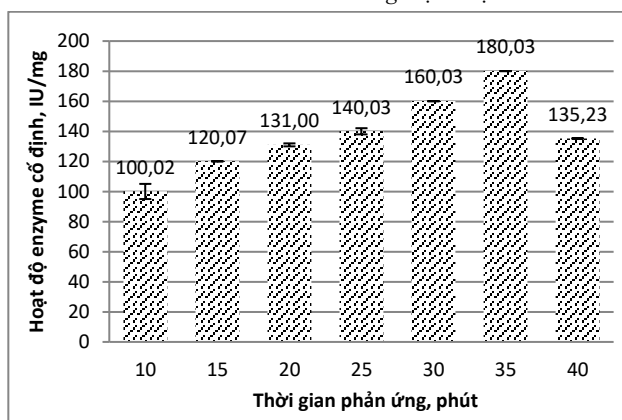


Hình 11. Sự phụ thuộc của hoạt độ của enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate vào pH môi trường phản ứng. Enzyme *Bacillus protease* tự do hoạt động tốt nhất trong môi trường có pH 7,5-8,5; Trong khi đó, enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate hoạt động tốt trong môi trường pH = 7,0-7,5, hoạt độ cực đại tại điểm pH 7,0

Trong phản ứng enzyme, nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong việc quyết định tốc độ của phản ứng. Tuy nhiên, nhiệt độ cũng có thể làm cho enzyme trở nên không hoạt động hoặc bị biến đổi cấu trúc [3]. Hình 12 thể hiện kết quả của việc khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên hoạt độ của *Bacillus protease* cố định. Phân tích kết quả cho thấy, hoạt độ của *Bacillus protease* cố định đạt giá trị cực đại (199,5 IU/mg) ở $t = 50^{\circ}\text{C}$. Hoạt độ của *Bacillus protease* cố định tăng dần ở vùng nhiệt độ từ 45°C đến 55°C và khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên trên 55°C thì hoạt độ bắt đầu giảm. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi việc ở nhiệt độ cao, *Bacillus protease* trở nên không ổn định nhiệt và bắt đầu bị biến đổi cấu trúc [7].



Hình 12. Sự phụ thuộc của hoạt độ của enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate vào nhiệt độ môi trường. Enzyme *Bacillus protease* tự do có nhiệt độ tối ưu - $t_{op} = 50^{\circ}\text{C}$, còn enzyme *Bacillus protease* cố định hoạt động tốt ở khoảng nhiệt độ rộng hơn từ 45°C đến 55°C có khả năng chịu nhiệt tốt hơn



Hình 13. Sự phụ thuộc của hoạt độ của enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate vào thời gian phản ứng. Với cơ chất là casein, enzyme *Bacillus protease* tự do cần 10 phút để đạt vận tốc phản ứng cực đại, enzyme *Bacillus protease* cố định đạt vận tốc cực đại ở thời điểm 35 phút, và chậm hơn so với enzyme tự do

Theo phương pháp Anson cải tiến, thời gian phản ứng để đo hoạt độ enzyme tự do là 10 phút, ở đây, enzyme tự do phân tán đều trong môi trường phản ứng. Tuy nhiên, đối với *Bacillus protease* cố định, khả năng phân tán kém hơn dẫn đến việc enzyme tiếp xúc kém hơn với cơ chất, vì thế, xác định thời gian phản ứng tối ưu của *Bacillus protease* cố định là cần thiết. Kết quả xác định sự phụ thuộc của hoạt độ của enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca-alginate vào thời gian phản ứng trình bày trên Hình 13. Đồ thị trên Hình 13 cho thấy rằng thời gian phản ứng tối ưu của enzyme là 35 phút, với hoạt độ cực đại đạt 180,03 IU/mg. Từ 10 phút đến 35 phút, hoạt độ của *Bacillus protease* tăng dần, có thể giải thích bởi hiệu ứng của quá trình khuấy đảo, làm cho cơ chất tiếp xúc tốt hơn với enzyme. Tuy nhiên, sau thời điểm 35 phút, hoạt độ của enzyme bắt đầu giảm dần, có thể là do enzyme bị ức chế bởi các sản phẩm phản ứng tích tụ, làm giảm sự tiếp xúc của cơ chất với trung tâm hoạt động của enzyme. Nhóm nghiên cứu đề xuất bổ sung một lượng CO_2 hóa lỏng phù hợp để tăng cường khả năng phân tán của cơ chất, từ đó tăng ái lực của cơ chất với enzyme.

4. Kết luận

Những kết luận khoa học có thể rút từ nghiên cứu này như sau:

- Đã định danh được chủng vi khuẩn S9 bằng kỹ thuật định danh phân tử là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus sp.* và được đặt tên là *Bacillus sp. S9*. *Bacillus sp. S9* thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+), có hoạt tính sinh enzyme protease ngoại bào, hoạt độ enzyme protease ngoại bào đo được là $2,833 \pm 0,0853$ IU/mL canh trường (đã tách sinh khối). Bằng kỹ thuật điện di zymogram xác định được khối lượng phân tử của enzyme protease ngoại bào của *Bacillus sp. S9* là 39 kDa và 70 kDa.

- Nhóm nghiên cứu đã chế tạo thành công enzyme *Bacillus protease* cố định trên gel Ca – alginate. Enzyme *Bacillus protease* có một số đặc tính như: pH tối ưu $pH_{op} = 7$, nhiệt độ phản ứng tối ưu $t_{op} = 50^\circ C$, thời gian phản ứng tối ưu $\tau_{op} = 35$ phút; hoạt độ enzyme cố định đo được ở điều kiện tối ưu là 180,03 IU/mg. Hiệu suất gắn enzyme protease lên chất mang (Ca-alginate) đo được là 84,34 % (so với lượng enzyme tự do ban đầu).

Lời cảm ơn: Bài báo này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng thuộc Đề tài có mã số B2022-DN02-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Basso and S. Serban, "Industrial applications of immobilized enzymes - A review", *Molecular Catalysis*, vol. 479, no. 18, pp. 1-20, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.
- [2] M. Akbarian, A. Khani, S. Eghbalpour and V.N. Uversky, "Bioactive peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 14-45, 2022. <https://doi.org/10.3390/2Fijms23031445>
- [3] S. A. Qamar, M. Asgher and M. Bilal, "Immobilization of Alkaline protease from *Bacillus brevis* Using Ca-Alginate Entrapment Strategy for Improved Catalytic Stability", *Silver Recovery, and Dehairing Potentialities. Catalysis Letters*, vol. 150, no. 12, pp. 3572-3583, 2020. DOI: 10.1007/s10562-020-03268-y
- [4] D. T. B. Thuy and T. T. Xo, "Research on the process of obtaining and surveying some properties of *Bacillus subtilis* protease preparation", *Vietnam journal of Agriculture and Rural development*, vol. 1, pp. 41-43, 2006.
- [5] J. Sambrook, P. Maccallum and D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd, editor. Cold Spring Harbor Press: NY, 2001. (ISBN 978-1-936113-41-5)
- [6] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura, "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- [7] Q. Wang, F. Ji, J. Wang, B. Jiang, L. Li, L. An, Y. Li and Y. Bao, "Characterization of a salt-activated protease with temperature-dependent secretion in *Stenotrophomonas maltophilia* FF11 isolated from frozen Antarctic krill", *J. Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 43, no. 6, pp. 829-840, 2016. DOI: 10.1007/s10295-016-1749-3
- [8] C. T. M. Duyen, N. T. Tan, V. T. B. Thuy and B. X. Dong, "Study on the effects of enzyme concentration and reaction time to the degree of hydrolysis of protein and antioxidant property in soybean milk (*Glycine max. l. merr.*) using *Bacillus protease*" in *Proceedings of the 4th National Scientific Conference on Biology Research and Teaching in Vietnam*, Hanoi, Vietnam, 2020, pp. 712-719. DOI: 10.15625/vap.2020.00088
- [9] T. T. M. Thu and K. Wunwisa, "Study on immobilization of enzyme by using complex polymer" in *Proceedings of the 4th National Young Fisheries Science Conference*, Ho Chi Minh city, Vietnam, 2013, pp. 58-63
- [10] D. Claus and R. C. W. Berkeley, "*Genus Bacillus Cohn 1872*", in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 (Sneath PHA ed.), Bergey's Manual Trust, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986. (ISBN: 978-0-387-95041-9)
- [11] M.G.B. Pagnoncelli, M.J. Fernandes, C. Rodrigues and C. R. Soccol, "Nattokinase in: Pandey, A., Negi, S. and Soccol, C.R. (Eds.). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products*". Elsevier Science. Amsterdam, 2017 (ISBN 978-0-444-63662-1)
- [12] L. V. A. Reddy, Y. J. Wee and H. W. Ryu, "Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus sp. RKY3*", *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 8, pp. 1526-1533, 2008. <https://doi.org/10.1002/jctb.1946>
- [13] D. Jain, I. Pancha, S. K. Mishra, A. Shrivastav. and S. Mishra, "Purification and characterization of halo-alkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus sp.*: a potential additive for laundry detergents", *Bioresour Technol*, vol. 115, pp. 228-236, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.081>
- [14] R. Sareen, P. Mishra, "Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 79, pp. 399-405, 2008. DOI: 10.1007/s00253-008-1429
- [15] W. Rachadech, A. Navacharoen, W. Ruangsit. and Thunyarat Pongtharangkul, "An organic solvent-, detergent-, and thermostable alkaline protease from the mesophilic, organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* 3C5", *Microbiology*, vol. 79, no. 5, pp. 630-629, 2010. DOI: 10.1134/S0026261710050061
- [16] S. K. Rai and A. K. Mukherjee, "Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04", *Biochem Eng J*, vol. 48, no. 2, pp. 173-180, 2010. DOI: 10.1016/j.bej.2009.09.007
- [17] M. N. Dung, "The hydrolyzing saccharose using the immobilized invertase in calcium alginate beads", *Science & Technology Development*, vol 10, no. 04, pp. 49-58. DOI: <https://doi.org/10.32508/stdj.v10i4.2772>